

ÉRTEKEZÉSEK EMLÉKEZÉSEK

TEPLÁN ISTVÁN

A GONADOLIBERINEK
SZEREPE,
HATÁSMECCHANIZMUSA
ÉS ALKALMAZÁSA
A SZAPORODÁSI
FOLYAMATOKBAN



87

AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST



ÉRTEKEZÉSEK
EMLÉKEZÉSEK

ÉRTEKEZÉSEK EMLÉKEZÉSEK

SZERKESZTI
TOLNAI MÁRTON

TEPLÁN ISTVÁN

A GONADOLIBERINEK
SZEREPE,
HATÁSMECCHANIZMUSA
ÉS ALKALMAZÁSA
A SZAPORODÁSI
FOLYAMATOKBAN

AKADÉMIAI SZÉKFOGLALÓ

1987. DECEMBER 15.



AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST

A kiadványsorozatban a Magyar Tudományos Akadémia 1982.
évi CXLII. Közgyűlése időpontjától megválasztott rendes
és levelező tagok székfoglalói — önálló kötetben — látnak
napvilágot.

A sorozat indításáról az Akadémia főtitkárának 22/1/1982.
számú állásfoglalása rendelkezett.

ISBN 963 05 5931 5

Kiadja az Akadémiai Kiadó, Budapest

© Teplán István, 1991

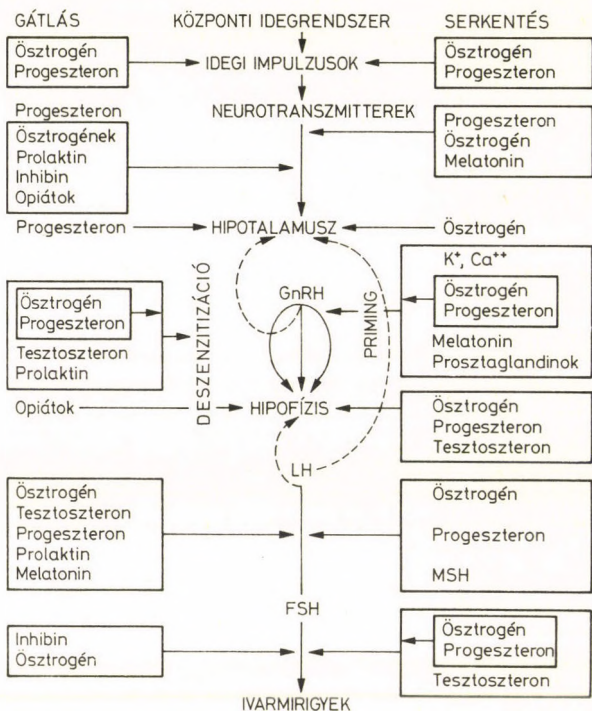
Minden jog fenntartva, beleértve a sokszorosítás, a nyilvános
előadás, a rádió- és televízióadás, valamint a fordítás jogát, az
egyes fejezeteket illetően is.

Printed in Hungary

Az élőlényeknek az az alapvető tulajdonsága, hogy képesek önmagukat reprodukálni, tudnak szaporodni, mindig is érdekelte az embereket, különösképpen a kutatókat. A szaporodási folyamatok szabályozásának, a szabályozás mechanizmusának tisztázása rendkívül fontos feladat, különösen izgalmas a gerinceseknél, ezen belül is elsősorban az emlősöknél, beleértve magát az embert is. A reprodukzív funkcióktól elválaszthatatlan nemi működés és a szexuális viselkedés folyamatai bonyolult hormonális és idegi szerveződés eredményeként jönnek létre, amelyben az idegrendszeri hatások mellett a hipotalamusz a hipofízis és a gonádok hormonális kölcsönhatásai érvényesülnek.

A nemi működés szabályozását egy különlegesen bonyolult, sokszorosán visszacsatolt és igen sok paraméter által befolyásolt rendszer végzi. A szabályozottságnak ezt a rendkívüli bonyolultságát, illetve az ellentétesen ható tendenciák és kölcsönhatások szövevényességét igyekszik — irodalmi adatok alapján — vázlatosan összefoglalni az 1. ábra.

Amennyiben a nemi működés szabályozását a gonadotrop hormonok — a follikulusz stimáló hormon, az FSH és a luteinizáló hor-



1. ábra. A nemi működés szabályozása

mon, az LH — felszabadulásán keresztül vizsgálják, akkor egyértelmű, hogy a szabályozás tengelyében a gonadotropin releasing hormon, a GnRH áll.

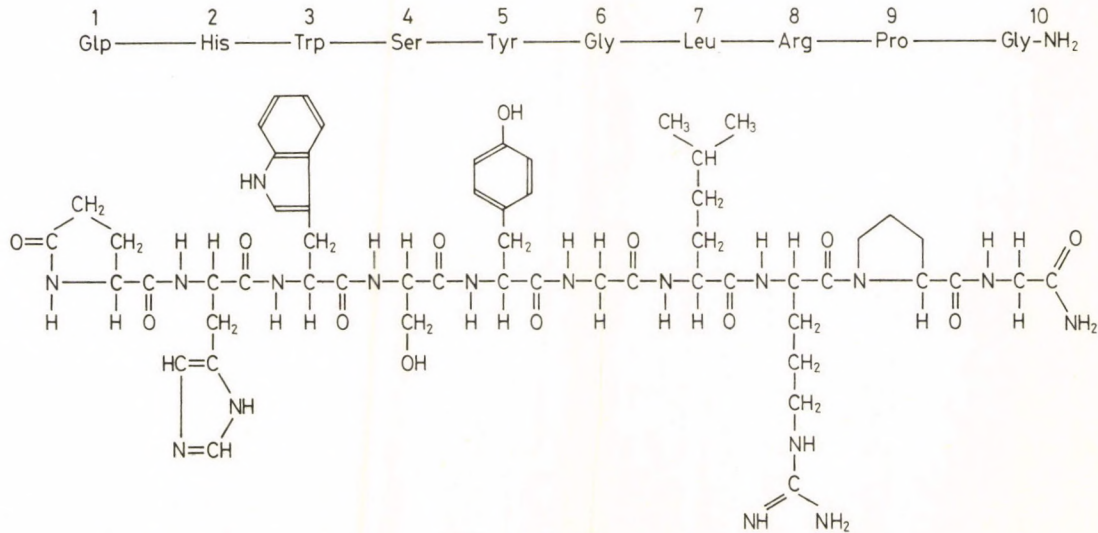
A luteinizáló és follikulusz stimáló hormonok szekréciójáért felelős hipotalamikusan eredetű faktorok feltételezése, kísérleti bizonyítása Geoffrey Harris nevéhez fűződik, aki már az

ötvenes években posztulálta ilyen faktorok létezését. A hatvanas években több kutatócsoport folytatott óriási versenyfutást az LH és FSH releasing faktorok, valamint más hipotalamikus eredetű faktorok izolálása és szerkezetmeghatározása terén. Végül is 1971-ben Andrew Schally kutatócsoportja került ki győztesen az LH-releasing hormon izolálásáért folytatott versenyből: nekik sikerült sertés hipotalamuszból az egységes hormont izolálni és szerkezetét meghatározni (2. ábra).

Ez a 10 aminosavból álló, piroglutaminsavval kezdődő és savamiddal végződő deka-peptid változatos aminosavösszetételt mutat, csupán a Gly ismétlődik benne, az Arg oldalláncának töltése miatt enyhén bázikus karakterű.

Schallytól függetlenül Roger Guillemin azonos szerkezetű faktort különített el birka hipotalamuszból, majd később az ugyanilyen szerkezetű releasing hormont megtalálták más emlős fajokban is. Közvetlenül a felfedezést követően megállapítást nyert, hogy ez a deka-peptid meglepő módon mindkét gonadotrop hormonnak, az LH-nak és az FSH-nak közös releasing hormonja.

A GnRH izolálását és szerkezet meghatározását követően felmerült annak a lehetősége, hogy ez a hormon, illetve származékai alkalmasak lehetnek reprodukciós biológiai folyamatok befolyásolására, szabályozására. Ebből kiindulva szerte a világon számos kutatólaboratórium — többek között a mi kutatócsoport-



2. ábra. A GnRH szerkezete

Humán terápia		Állatgyógyászat
♀ Primer és szekunder amenorrhoea	♂ Hypogonadotrop hypogonadismus (Oligospermia)	♀ Ovuláció kiváltás Ovuláció szinkronizálás

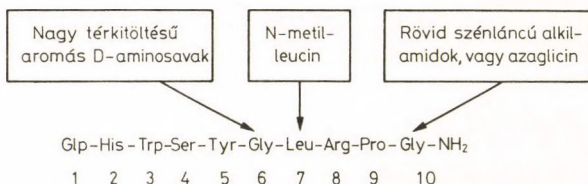
3. ábra. A GnRH és „szuperaktív” származékainak alkalmazása a gyakorlatban

tunk is — igen intenzív kutatásokat indított különböző GnRH-származékok, -analógok előállítására, mégpedig két irányba:

- egyrészt olyan *agonista* származékok előállítására, amelyek a természetes hormonnál lényegesen hatékonyabbak, elnyújtott hatásúak és képesek eleget tenni a farmakokkal szemben támasztott általános követelményeknek. A ilyen ún. szuperaktív vegyületektől (3. ábra) részben a humán meddőség bizonyos formáinak kezelését, illetőleg az állattenyésztésben az ovuláció kiváltásán keresztül a termékenyülés, a termékenység növelését reméltük,
- másrészt, olyan *antagonista*, kompetitív inhibitorként működő származékok előállítását tűztük ki célul, amelyek képesek gátolni az ovulációt, illetve ezen keresztül a megtermékenyülést.

Az agonista származékok előállítására, valamint ezek szerkezethatás összefüggéseinek tisztázására irányuló intenzív kutatásaink nemcsak nagyszámú szuperaktív analóg elké-

szítését eredményezték, hanem — összhangban más kutatók eredményeivel — néhány általánosnak tekinthető szubsztitúciós elv felismerését is lehetővé tették (4. ábra).



4. ábra. A szubsztitúciók együttes alkalmazása nyújtott hatású, „szuperaktív” vegyületekhez vezet

Az egyik igen lényeges szubsztitúció a 6. pozícióban lévő glicin, minél nagyobb térkitöltésű, apoláros, különösen aromás D-aminosavakkal történő helyettesítése, aminek következtében részint a vegyület kedvező konformációt nyer a receptorhoz való kötődéshez, másrészt, megnő a molekula enzimrezisztenciája is. Úgy tűnik, hasonló szerepet tölt be a 7. pozícióban N-Me-Leu-aminosavval történő helyettesítés is. Igen előnyös szubsztitúció a 10. pozícióban lévő glicinamidrészt alkilamidokkal, esetleg azaglicinnel történő helyettesítése. Ezen két helyettesítés együttes alkalmazása elnyújtott hatású, valódi szuperagonistákat eredményezett.

A ma ismert legaktívabb vegyületek alapvetően az említett két kulcsszubsztitúció kombinációját tartalmazzák, amelynek eredménye-

ként ezeknek a szuperaktív analógoknak az aktivitása kb. 50—200-szor múlja felül a natív GnRH aktivitását (5. ábra). Az 5. ábrán szerepel az egyik általunk előállított és „Ovurelin” néven Magyarországon forgalomba hozott GnRH-származék is, amelynek az LH és FSH felszabadító hatását a 6. ábrán tüntettük fel. Látható, hogy ennek a GnRH-hoz viszonyítva jelentősen nagyobb és hosszabban tartó az LH és FSH felszabadító hatása.

Tulajdonképpen bármilyen nagy térkitöltésű, hidrofób oldallánccal rendelkező D-aminosavval történő helyettesítés a 6. pozícióban szuperaktív analógot eredményez. Mi kettős indítatásból próbáltuk ki a 4-klór-D-fenilalanin⁶, a D-tironin⁶ és a D-tiroxin⁶ szubsztitúciókat, amelyeknek a biológiai aktivitását mutatja a 7. ábra. Látható, hogy

- egyrészt ezek az aminosavak nagy térkitöltésű, lipofil oldallánccal rendelkeznek, tehát a natív hormonhoz képest jelentős hatásnövekedést reméltünk. Mind *in vitro*, mind *in vivo* jelentős az LH felszabadító hatás növekedése,
- másrészt az oldalláncok aromás gyűrűjében lévő halogénatomok katalitikusan könnyen kicserélhetők tríciumra, és így a hormonanalóg radiojelzésével a hatásmechanizmus—metabolizmus kutatások számára értékes anyagot állíthatunk elő. A tríciummal jelzett GnRH-analógokra a későbbiek során még visszatérünk.

Vegyület										Gyártó/termékszám és/vagy márkanév	Relatív LH-felsza- badítás in vivo (GnRH = 1)
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
————					D-Ala				NHEt	Ayerst/AY-25205 Wyeth/WY-18481 American Home Products	50—70
————					D-Leu				NHEt	Takeda/TAP-144 Serous/Leuprolide	70—100
————					D-Trp				NHEt	Ayerst/AY-25650	70—100
————					D-Trp				NHEt	Syntex	120—150
*					D-Trp-Nml				NHEt	Wyeth/WY-40972	120—160
**					D-Nal (2)					Syntex/Nafarelin	180—220
					D-Ser (tBu)				NHEt	Hoechst/HOE-766/Buserelin	140—170
***					D-Ser (tBu)				AzGly	ICI/118630	70—100
					D-Phe				NHEt	Reanal/Ovurelin	100—130

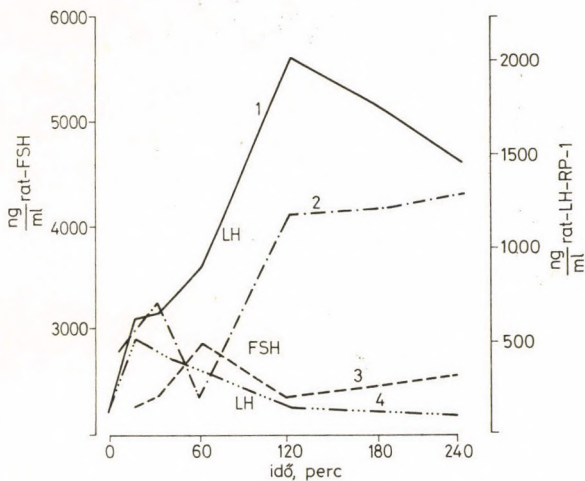
Rövidítések:

* Nml = N-metil-leucin

** Nal (2) = (2-naftil)-alanin

*** AzGly = azaglicin

5. ábra. 1987-ben ismert legaktívabb GnRH-analógok

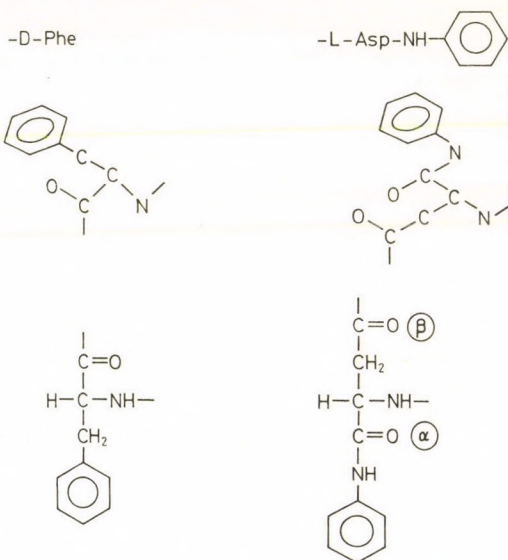


6. ábra. Az ovurelin ([D-Phe⁶] GnRH – (1–9) – EA) és a natív GnRH LH- és FSH-felszabadító hatása. (Hím egér, 1µg/állat, subcutan) 1,2 görbe; ovurelin hatás, 3,4 görbe; GnRH hatás

Analóg	ED ₅₀ × 10 ⁶ (M)	In vitro Hipofízis sejtkultúra Rel. aktivitás	In vivo szérum Rel. aktivitás
GnRH	343,6	1,0	1,0
[D-Thx ⁶] GnRH- (1–9) -EA	28,9	11,9	0,3
[D-Thy ⁶] GnRH- (1–9) -EA	24,3	14,1	14,2
[D-Cpa ⁶] GnRH- (1–9) -EA	20,6	16,6	15,3

7. ábra. GnRH-analógok LH-felszabadító képessége patkányban

A 6. pozícióban lévő glicin D-aminosavakkal való helyettesítése során kapott szuperaktív analógok, valamint az a kísérleti tapasztalat, miszerint az L-konfigurációjú aminosavakkal végrehajtott szubsztitúciók e pozícióban a molekula teljes aktivitásvesztését eredményezik, ahhoz a feltételezéshez vezettek, hogy a D-konfiguráció a molekula ezen részében egy olyan béta-turn képződését stabilizálja, amely a biológiailag aktív konformáció kialakulásához elengedhetetlen, míg az L-konfiguráció ennek kialakulását gátolja (8. ábra).



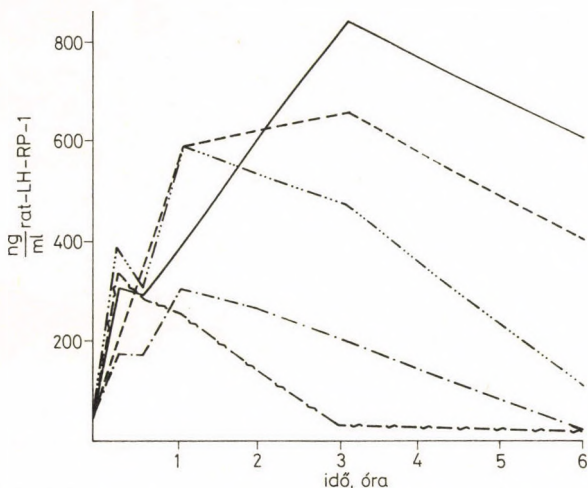
8. ábra. D-aminosav és izo-L-aszparaginsav térszerkezeti hasonlósága

Ezek a konfigurációs, konformációs megfontolások vezettek bennünket arra a következtetésre, hogy bizonyos L-konfigurációjú aminosavak, mint pl. az izoaszparaginsav vagy izoaszpartilcsoport — a nagyfokú szerkezeti hasonlóság következtében — képesek lehetnek a D-aminosavak által stabilizált konformáció kialakulását elősegíteni, amely szükséges a szuperaktív hatás eléréséhez. Ennek az elvnek az alapján szintetizáltunk különböző izoaszpartilcsoportot tartalmazó GnRH-analógokat, amelyekben a β -karboxilcsoport-hoz különböző méretű és lipofilitású atomcsoportok kapcsolódnak. Az így előállított analógjainkat és azok biológiai aktivitását, illetve az egyik származék LH felszabadítási görbéjének időbeli lefutását mutatja a 9., illetve a 10. ábra.

A szuperaktív analógok harmadik — az előzőekben ismertetett kettőtől elvileg különböző — csoportjához egy többé-kevésbé véletlen felismerés vezetett. Sokáig tartotta magát az a vélemény, hogy a GnRH nem fajspecifikus és valamennyi ivari úton szaporodó fajnál ugyanaz a szekvenciája. 1982—83-ban azonban ismertté vált — főleg Millar és Rivier munkája nyomán — a csirke és a lazac GnRH, amelyek 1—2 aminosavrészben eltérnek az emlős GnRH szekvenciájától (11. ábra). Az alapszekvencia meglehetősen konzervatív. Azonban az evolúció során ezek az aminosavösszetételben bekövetkezett, lényegtelennek tűnő

Analóg	ED ₅₀ (15. perc) ng/állat	Összes LH 6 óra alatt relatív aktivitás
GnRH	22,5	1,0
[L-isoAsp ⁶ -NH ₂] GnRH	593,5	0,4
$\left[\text{L-isoAsp}^6\text{-NH-} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \quad \end{array} \right] \text{GnRH}$	346,4	0,4
$\left[\text{L-isoAsp}^6\text{-N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \quad \end{array} \right] \text{GnRH}$	321,4	0,4
$\left[\text{L-isoAsp}^6\text{-NH-} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \quad \end{array} \right] \text{GnRH}$	257,5	1,2
$\left[\text{L-isoAsp}^6\text{-NH-} \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{C-CH}_2\text{-} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \quad \end{array} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \right] \text{GnRH}$	73,5	1,7
$\left[\text{L-isoAsp}^6\text{-N} \begin{array}{c} \text{Et} \\ \diagdown \\ \diagup \\ \text{Et} \end{array} \right] \text{GnRH- (1-9) -EA}$	708,3	0,8
[L-isoAsp ⁶ -OtBu] GnRH- (1-9) -EA	1070,0	1,1
[L-isoAsp ⁶ -OH] GnRH- (1-9) -EA	35,1	1,0
[L-isoAsp ⁶ -OBzl] GnRH- (1-9) -EA	30,2	12,0
[L-isoAsp ⁶ -OMe] GnRH- (1-9) -EA	39,4	20,0

9. ábra. GnRH-analógok relatív LH-felszabadító hatékonysága egérben



10. ábra. [L-isoAsp-OMe⁶] GnRH – (1–9) – EA LH-felszabadító hatása. — 4μg, --- 0,8μg, 0,16μg, — · — 0,08μg, — ~ — 0,016μg, GnRH

változások a hormonok hatásában — különösen az alacsonyabbrendű fajoknál — lényeges eltéréshez vezettek és egymással nem helyettesíthetők.

A csirke és a lazac GnRH-szekvenciájának közlése után szinte azonnal elkészítettük — a már bevált szubsztitúciós elvek alapján — azok 6-7-8-as pozícióban módosított származékait, közülük különösen a 8. sorszámú mutatkozott igen hatékonynak egyes halfajok ovulációjának kiváltásában. Mindhárom szuperaktív vegyületcsoportból számos szabadalmi bejelentés történt úgy a kémiai anyag (ter-

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
EMLŐS	Glp	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly-NH ₂	(1971)
CSIRKE I	Glp	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Gln	Pro	Gly-NH ₂	(1982)
CSIRKE II	Glp	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Tyr	Pro	Gly-NH ₂	(1984)
LAZAC	Glp	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly-NH ₂	(1983)
ORSÓHAL	Glp	His	Tyr	Ser	Leu	Glu	Trp	Lys	Pro	Gly-NH ₂	(1986)

SZINTETIKUS TERMÉK

1.	_____	D-Phe	_____	Gln	_____
2.	_____	D-Phe-Trp-Leu	_____		_____
3.	_____	_____	_____	Trp-Gln	_____
4.	_____	_____	_____	Phe-Gln	_____
5.	_____	_____	_____	Phe-Leu	_____
6.	_____	_____	_____	Trp-Leu	_____NH-C ₂ H ₅
7.	_____	_____	_____	Trp-Gln	_____NH-C ₂ H ₅
8.	_____	D-Phe	_____	Gln	_____NH-C ₂ H ₅

11. ábra. Fajspecifikus GnRH-analógok és származékainak szerkezete

mék), mint a biológiai alkalmazás védelmének biztosítására. Közülük jónéhány, közel harminc országban biztosít számunkra védelmet, egy termék már Ovurelin néven forgalomba került, kettő pedig a gyógyszerre fejlesztés stádiumában van.

Mi is ezeknek a termékeknek, eljárásoknak a gyakorlati jelentősége? Itt most csak az állattenyésztési, állatgyógyászati alkalmazásokkal foglalkoznék, amelyeket közel egy évtizede folytatunk, együttműködésben különböző állattenyésztési vállalatokkal, gazdaságokkal, állatgyógyászati intézményekkel.

A hipotalamusz—hipofízis rendszer abnormális működése miatt a szexuális ciklusban

fellépő zavarok csakúgy, mint a takarmányozási és tartási hiányosságok gátolni képesek a petefészek normális működését, s hosszabb távon abban reverzibilis vagy irreverzibilis elváltozásokat okozhatnak. Kívülről bevitt gonadotropinokkal, illetve az endogén gonadotropinokat felszabadító GnRH-val a szaporodást gátló folyamatok jó része visszafordítható. Természetes forrásból származó gonadotropin tartalmú készítményeket korábban is használtak az említett rendellenességek korrigálására. A magas ár, a természetes forrás limitáltságából adódó nehezebb hozzáférhetőség, az esetenként fellépő toxikus hatás mellett, a natív eredetű gonadotropinok alkalmazását az is korlátozza, hogy a csupán izolálási módszerrel előállítható, fehérje természetű anyagok fajspecifikusak, és így számos esetben antigénként viselkednek.

A GnRH szintetikus, szuperaktív analógjai mindezekről a hátrányokról mentesek, így az említett területeken széles körű alkalmazásuk érthető. Az alábbiakban ezekből kívánok — a teljesség igénye nélkül — bemutatni néhány alkalmazási területet, amelyek kidolgozása kooperációban történt.

Az egyik GnRH-készítményünk (az Ovurelin) szarvasmarhákban történt széles körű kipróbálásának eredményeit foglalja össze a 12. ábra. A kísérletek közel húsz nagyüzemi állattenyésztő gazdaságban, illetve mesterséges megtermékenyítő állomásokon folytak, több

	Vemhesült/Összes kezelt	
Ovariális ciszta szindróma	53/74	(72%)
Anösztrusz	39/56	(70%)
„Repeat breeder” szindróma	48/80	(60%)
Korai ciklusindukció (involúció)	31/42	(78%)

Inszeminálással egyidejű egyszeri kezelés hatása

Dózis	Vemhesült/Összes kezelt		Kontroll
100µg i.m.	351/730	(48%)	35%

12. ábra. Szexuális rendellenességeket mutató szarvasmarhák ovulelinnel történő többszöri kezelésével és inszeminálásával elért eredmények

éven keresztül. A készítmény tüszőérésre, sárgatestképződésre és az ovulációra kifejtett stimuláló hatása folytán új ciklust képes indukálni az ovariális diszfunkciós állatokban, tisztán elfajult petefészek és anösztrusz esetén. A tejtermelő, különösen a jó tejhozamú szarvasmarhák szaporodási rendellenességei általában a méh ellés utáni visszaalakulásának — involúciójának zavaraira vezethetők vissza. A készítmény ez esetben mint meddőséget megelőző kezelés hasznos, és jelentősen növeli a termékenyülési arányt.

Külön szeretném kiemelni azt a kezelési módszert, amikor az egészséges állatok az inszeminálással egyidőben kapják a készítményt.

Ez esetben a termékenyülési arány közel 30%-kal emelkedik.

Sertésekkel végzett kísérletek is igen jelentős gyakorlati eredményekkel kecsegtetnek. Egy kooperációban végzett kísérletsorozat alapján kellő biztonsággal és eredményességgel lehet a nagyüzemi körülmények között tartott sertésen az ovulációt kiváltani a már forgalomban lévő Ovurelin alkalmazásával. A több év alatt felhalmozódott kísérleti tapasztalatok alapján sikerült megállapítani a sertések reprodukciós ciklusának azt az optimális időpontját, amikor a szuperaktív GnRH-analógok nemcsak az állatok fertilitását növelik meg jelentősen, hanem lehetőséget adnak az ivarzás szinkronizálására és a szaporulatot is fokozzák 20—30%-kal.

Egyéb állatfajokon is eredményes próbálkozások történtek a különböző GnRH-analógok felhasználására. Így pl. nyulak esetében, számos helyen már a megtermékenyítés technológiájába beépült ezeknek a szereknek az alkalmazása, és így ma már szinte nélkülözhetetlen a használatuk.

A fajspecifikus szuperaktív GnRH-analógok egy specifikus eljárás alkalmazásának keretében igen alkalmasnak bizonyultak, gazdaságilag jelentős halfajok, mint pl. a tokfélék szaporítására, melyek mind ez ideig mesterséges körülmények között nem voltak szaporíthatók. E témában több szabadalom került elfogadásra, melyek gyakorlati használatbavéte-

Indukált mesterséges szaporítás					
Halfaj	Összes ismétlés	Kezelt halak darabszáma	Ovulációs %	Terméke-nyülés %	Felnevelt ivadék · 10 ⁶
Csuka	30—40	kb. 1100	50—90	> 90	8—11
Sügér	100	1500	95—100	30—90	20—30
Süllő	6	153	60—80	85—95	1— 2
Kecsege	50—70	2000	75—80	75—90	1
Ponty	10—20	100	60—80	90—100	5— 6
Amur	5	15	60—80	80—90	0,5
Busa	5	15	60—80	80—90	0,5
Harcsa	25—30	150	60—70	90—95	4— 5
Indukált mesterséges szaporítás szezonon kívül					
Kecsege	15—20	200	40—60	40—70	0,4
Harcsa	10—15	60	30—60	80—95	1,2
Pisztráng	5	60	Valamennyi kezelt hal reagált		
Ponty	10—15	100	50—70	80—95	—
Dízponty (koi)	5	38	50—70	80—90	1,3
Aranyhal c. v.		57	65—70	70—90	0,08

13. ábra. [D-Phe⁶, Gln⁸]GnRH-(1—9)-EA alkalmazása a halszaporításban

le folyamatban van. Ezen vegyületek egyikének alkalmazásával igen jó eredményeket értünk el különböző halfajták indukált, mesterséges szaporításában. Az analóg alkalmas különféle halak szezonon kívüli mesterséges szaporítására is (13. ábra).

A madarak spermatogenezisének és libidójának GnRH-analógokkal való fokozhatóságának lehetőségét még 1978-ban ismertük fel, amikor is azt tapasztaltuk, hogy a klasszikus GnRH szuperaktív analógok néhányszori, kis mennyiségének pulzáló módon történő adagolása után a spermatogenezis, így a spermiumok száma, mozgékonyága, életképessége, valamint az állatok szexuális aktivitása jelentősen megnő és a kezelést követően hónapokon keresztül tartósan fennmarad. Biológus partnerekkel kakasokon — majd a felismerést kiterjesztve nyulakon és szarvasmarhákon — végzett *in vivo* kísérletek alapján azt találtuk, hogy ezek az analógok igen alkalmasak a tenyésztett állatfajok hím egyedeinél az esetleges szexuális rendellenességek korrigálására, illetőleg a fertilitás növelésére.

Összegezve megállapítható, hogy a GnRH szuperaktív, illetőleg fajspecifikus származékai a 80-as évek közepére hazánkban ha vontatottan is, de bevezetésre kerültek. Az alkalmazásukhoz fűzött reményeket már részben beváltották, illetőleg a GnRH-analógokra alapozott új biológiai eljárásoknak a termelési folyamatokba való beillesztése napirenden van.

1. Diagnosztikus alkalmazás

A hipotalamusz-hipofízis-gonád rendszer működésének ellenőrzése

2. Terápiás alkalmazás

Reproduktív funkciók stimulálása amenorrhea, anovuláció, hipogonadizmus, cryptorchidizmus, oligospermia, stb. esetén
Pubertás praecox, gonadális szteroid-dependens tumorok, endometriózis, ovarialis ciszták, hirsutismus kezelése

3. Fogamzásgátlás

Ovulációgátlás
Spermatogenezis gátlása

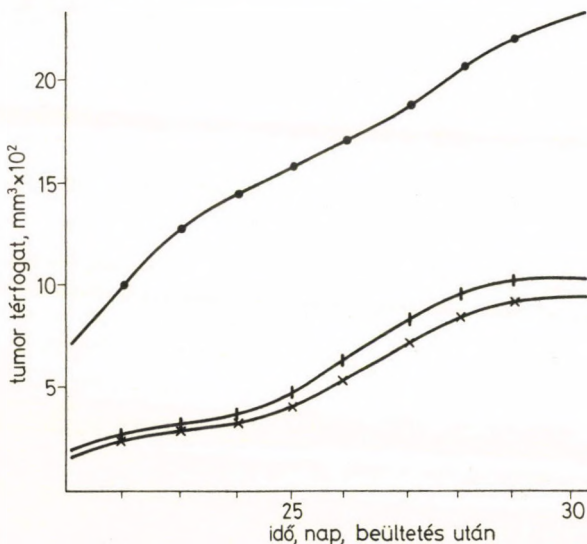
14. ábra. GnRH és analógjainak klinikai alkalmazási lehetőségei

Ugyanakkor a hazai humán gyógyászat területén rendkívül sokrétű, széles körű alkalmazási lehetőség kínálkozna (14. ábra). Minden erőfeszítésünk dacára alig akad említésre okot adó kezdeményezés. Az utóbbi időben derült fény arra, hogy a szuperaktív hormonszármazékoknak igen komoly szerepe lehet az olyan hormondependes tumorok kezelésében, gyógyításában, mint a prostata- és az emlőrák. Ezért mi is kezdeményeztük — megfelelő kooperációban — az ezzel kapcsolatos vizsgálatokat.

Ismeretes, hogy a férfiaknál prostata-, nők-
nél — elsősorban idősebb korban — az emlő-
tumor a leggyakrabban előforduló rákos meg-
betegedés. Humán emlőrákos sejtekben egyér-
telműen bizonyított az ösztrogén és prolaktin

jelenléte, ami a hormonfüggés alapvető bizonyítéka.

A szuperaktív GnRH-származékok antitumor aktivitása az általunk is részleteiben vizsgált hormonális deszenzitizáció mechanizmusára vezethető vissza. Ezért is láttuk indokoltnak az ilyen irányú *in vivo* vizsgálatok elindítását, amelyekhez az *in vitro* deszenzitizációs vizsgálatokban legaktívabbnak mutakozó analógunkat használtuk. A D-Cpa⁶-GnRH-etilamid — egerekben indukált emlőrák esetén — a transzplantációt, illetve a kezelést követő 30. napon a kezetlen kontrollokhöz képest 60%-kal csökkentette a tumortérfogatot, me-



15. ábra. A [D-Cpa⁶]GnRH-(1-9)-EA tumortérfogatra gyakorolt hatása. —●— kontroll, —+— 100µg, —x— 200µg

lyet a szakirodalomban elfogadott konvenciók szerint mértünk (15. ábra). A tumor súlya 40—45%-kal csökkent 100, ill. 200 µg peptid/nap dózisú kezelést követően. Másrészt viszont a kezelés hatására — a transzplantációt követő 30. napon történt elbírálás alapján — az indukált tumorok kialakulásának aránya 25%-kal csökkent (16. ábra). Ezek az adatok egyértelműen igazolják, hogy ennek az anyagnak jól definiált tumorgátló hatása van emlőrák esetében. Természetesen a humán kipróbálás és alkalmazás megkezdéséig még igen sok vizsgálatra van szükség és szeretnénk a vizsgálatokat másfajta — elsősorban prosztatata és ovarialis tumorokra is kiterjeszteni.

Amikor ovulációs szabályozásról beszélünk, feltételezzük annak gátlását is, nemcsak kiváltását. Feltételezhető volt, hogy a GnRH megfelelően módosított származékai, kompetitív inhibitoroként alkalmasak lehetnek ovulációgátlásra, tehát fogamzásgátlásra. 1973-ban egy amerikai kutatócsoportnak sikerült

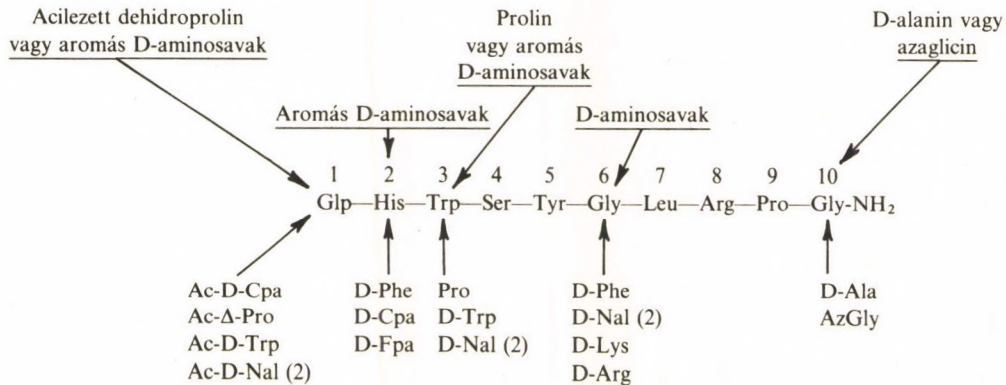
Kezelés	Tumor létrejötte, %	Tumor súlya, mg ± S.D.	Tumor gátlás %
Nem kezelt	92	3663 ± 978	0
100 µg/nap	75	2201 ± 895	39,9
200 µg/nap	67	2020 ± 836	44,85

16. ábra. [D-Cpa⁶]GnRH — (1—9) — EA hatása BDR-1 egerekben indukált MXT mammary carcinomatumor súlyára és az indukció létrejöttére

az első biztató lépést megtennie az ovulációgátló GnRH antagonisták előállítása terén. A 2. hisztidin elhagyásával teljesen inaktív molekulát nyertek, amely nagy koncentrációban ugyan, de kompetitív inhibitornak bizonyult.

Az elmúlt 10 év során elért kutatási eredményekből leszűrhető, hogy bizonyos szubsztitúciók hatékony antagonista vegyületeket eredményeznek. Az 1, 2, 3, 6 és 10. pozíciójú aminosavak megfelelő helyettesítése vezet a leghatékonyabb inhibitorokhoz (17. ábra). A tapasztalat azt mutatja, hogy ezek bizonyos kombinációi a gátló hatást fokozzák, az egyes szubsztitúciókból származó hatás összegződik. Sajnálatos módon azonban ez az additivitás nem általános érvényű, és ez a tény rendkívül megnehezíti a hatékony származékok tervezését. Mintegy 1000-re tehető azon GnRH-inhibitorok száma, amelyeket az elmúlt 10 év során világszerte előállítottak, közülük közel 100 a mi laboratóriumunkban készült. A leghatásosabb vegyületek 4—5 D-aminosavat tartalmaznak, és így még kis dózisban is meg lehetősen költséges fogamzásgátló szernek ígérkeznek.

Az antagonista vegyületek előállítása terén általunk elért jelentősebb eredményeket a 18. ábra foglalja össze. Az egyre aktívabb vegyületek előállítása természetesen nem vált volna lehetővé megfelelő és megbízható teszt módszerek nélkül. Az általunk előállított vegyületek



Az 1982-ben leírt legaktívabb GnRH inhibitorok

Vegyület										Szerző(k)	ID ₁₀₀ *
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Ac-D-Cpa	D-Cpa	D-Trp			D-Arg				D-Ala-NH ₂	Coy et al.	3.0 μg
Ac-Δ-Pro	D-Fpa	D-Nal (2)			D-Nal (2)					Rivier et al.	2.5 μg
Ac-D-Trp					D-Lys				D-Ala-NH ₂	Mező et al.	2.0 μg
Ac-D-Nal (2)					D-Arg				D-Ala-NH ₂	Horváth et al.	1.0 μg

* 100%-ban gátló dózis

17. ábra. Szubsztitúciós lehetőségek hatékony GnRH-inhibitorok tervezéséhez

Vegyület											Ovulációt 100%-ban gátló dózis, mg*
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1975	Glp	D-Phe-Phe	Ser	Tyr	D-Phe	Leu	Arg	Pro	Gly-NH ₂		3.0
1976		D-Phe-D-Trp				D-Phe					1.0
1977		D-Phe-D-Trp				D-Lys					0.25
		D-Phe-D-Trp				D-Lys					
1978	D-Glp	D-Cpa-D-Trp				D-Phe					0.12
1979	Ac-D-Cpa	D-Cpa-D-Trp				D-Phe					0.05
1980	Ac-D-Cpa	D-Cpa-D-Trp				D-Phe				D-Ala-NH ₂	0.01
1981	Ac-D-Cpa	D-Cpa-D-Trp				D-Lys				D-Ala-NH ₂	0.002**
1982	Ac-D-Nal (2)	-D-Cpa-D-Trp				D-Arg				D-Ala-NH ₂	0.001***

* Egyszeri s. c. dózis a proestrus napján

** Tartósan (14 nap) gátlja az ovulációt 5 µg/patkány s. c. dózisban

*** 100% ovulációgátlás 2 mg/patkány orálisan adott dózisban is.

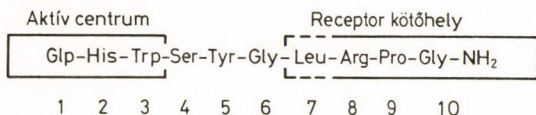
18. ábra. GnRH-inhibitorok és biológiai aktivitásuk

ovulációgátló hatásának mérését részint magyar, részint amerikai orvospartnereink végezték. Az évszámok és dózisok nagyon jól szemléltetik a megtett utat. Külön említést érdemel a két legújabb származék. A D-lizin tartalmú vegyület az első olyan analóg, amely kis dózisban is biztosítja az ovulációgátlást tartós kezelés folyamán, míg a D-arginin tartalmú származék az első, orális beadást követően is aktív inhibitor.

A ma ismert vegyületek, még meglehetősen költségesek a gyakorlat számára, a biztató tendencia azonban reményekre jogosít bennünket. Azt, hogy ezekből lesz-e és ha igen, mikor lesz fogamzásgátló szer, ma megmondani nem lehet.

Bármilyen szubsztitúció a molekula N-terminális régiójában, de különösen a 2. pozícióban az adott analóg LH és FSH felszabadító aktivitásának teljes elvesztését eredményezi. Ezért a molekulának ezt a részét tartjuk felelősnek a biológiai hatásért, ugyanakkor a molekula C-terminális részen történő megfelelő szubsztitúciók — növelve a receptorhoz való kötődést és az enzimrezisztenciát — úgy az agonista, mind az antagonistá sorban fokozzák azok aktivitását (19. ábra).

A GnRH antagonisták kutatásának egyre biztatóbb fejlődésével párhuzamosan a fertilitás fokozására irányuló kísérletek, amelyek elsőrsorban a legaktívabb szuperagonista származékokkal — krónikus kezelés keretében



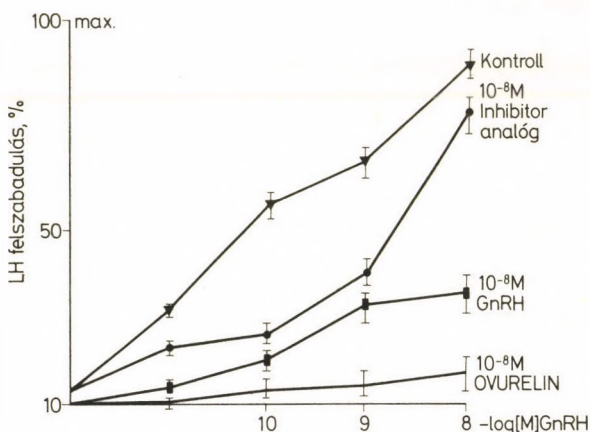
19. ábra. A GnRH-molekula különböző régióinak szerepe a biológiai aktivitásban

— végeztek a 70-es évek végére nagyon meglepő eredményeket hoztak. Egyre több publikáció jelent meg a szuperaktív GnRH-származékok „paradox antifertilitást” kiváltó hatásáról. A kísérletek számos esetben éppen a fertilitás csökkenéséhez vezettek mindkét nemben! Az ezzel kapcsolatos saját eredményeinket a 20. ábra szemlélteti. Ennek egyik elfogadható mechanizmusa a GnRH-nak közvetlen a gonádokra kifejtett hatása lett volna. Ilyen közvetlen hatást azonban hosszú ideig csak bizonyos fajokban lehetett kimutatni, például pat-

Analóg	Dózis/nap	Cikluszgát- lás 21 napon át
[D-Phe ⁶] GnRH- (1—9) -EA	0,25 µg	100 %
	0,1 µg	50 %
[D-Thy ⁶] GnRH- (1—9) -EA	0,25 µg	100 %
	0,1 µg	25 %
[D-Cpa ⁶] GnRH- (1—9) -EA	0,25 µg	100 %
	0,1 µg	0 %
[L-isoAsp-OMe ⁶] GnRH- (1—9) -EA	0,5 µg	75 %
	0,35 µg	50 %

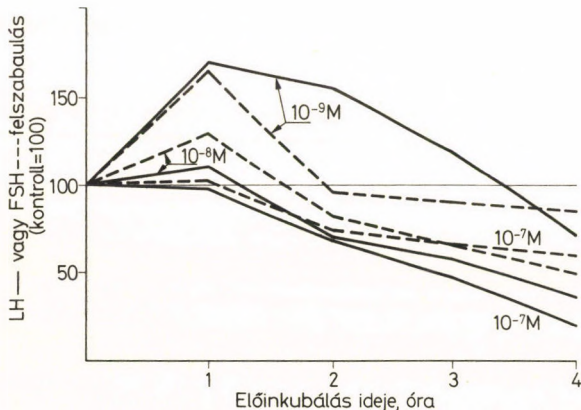
20. ábra. Nőstény patkányok GnRH-analógokkal történő tartós kezelésének ovulációt gátló hatása

kányban, emberben azonban nem. További lehetőségként felmerült valamilyen hipofízis-szintű gátló mechanizmus, amely a szuperaktív GnRH-analógokkal való tartós kezelés során lép fel. Ezen lehetőség tisztázására más kutatócsoportokkal egyidőben, de azoktól függetlenül, mi is vizsgálni kezdtük a hipofízis deszenzitizációjának lehetőségét. Azt találtuk, hogy *in vitro* körülmények között — hipofízis sejt kultúrában — a GnRH és szuperagonista származékai érzéketlenítik a hipofízis gonadotrop sejtjeit a további stimulussal szemben (21. ábra). Az antagonisták ilyen hatást nem okoznak. Ezen vizsgálataink során azt is kimutattuk, hogy a GnRH-, illetve a szuperaktív GnRH-származékok is, a dózistól, illetve a preinkubáció idejétől függően nem-



21. ábra. GnRH-analógok által indukált deszenzitizáció

csak deszenzitizálni, de szenzitizálni is képesek a hipofízis gonadotrop sejtjeit. Úgy tűnik, hogy ez a hatás részben receptorszintű, részben intracelluláris folyamatok következménye. Az *in vitro* körülmények között kidolgozott szenzitizációs protokollt a későbbiek során *in vivo* állatkísérleteinkben széleskörűen alkalmaztuk. Vizsgáltuk az LH és FSH felszabadulását a preinkubációhoz alkalmazott GnRH koncentrációjának és a preinkubáció idejének függvényében, ismételtén hozzáadott GnRH-pulzus hatására (22. ábra). Látható, hogy a preinkubáció idejének, illetve a preinkubációs koncentrációnak a növelése deszenzitizációhoz vezet, ami magyarázza a 20. ábrán bemutatott paradox antifertilitási hatást. A hipofízis érzéketlenítésének mechanizmusa rendkívüli



22. ábra. GnRH által indukált szenzitizáció és deszenzitizáció

jelentőségűvé vált, olyannyira, hogy a legaktívabb szuperagonista vegyületekkel már fogamzásgátlási kísérleteket is indítottak. A biztató eredmények alapján nem lenne meglepő, ha néhány éven belül bevezetésre kerülne egy GnRH szuperagonista mint fogamzásgátló.

Mint látható a deszenzitizáció mechanizmusából következik tehát, hogy a GnRH szuperagonisták tartós kezelés során csökkentik a luteinizáló és a follikulusz stimuláló hormonok szintjét, ezen keresztül pedig a nemi szteroidok koncentrációját. Valószínű ezzel függ össze, hogy bizonyos hormondependens emlő- és prosztatatumorok kezelése biztató eredményeket hozott.

Felmerül azonban a kérdés, hogy ha nemcsak a GnRH-antagonisták, de még a „szuperagonisták” is gátló hatásúak lehetnek, hogyan fokozható a termékenység, kezelhető-e a hypogonadtoróp hypogonadizmus, illetve az amennorrhea GnRH, illetve származékai segítségével?

A válaszhoz a mechanizmusok finomabb részleteinek megismerése útján jutottunk el (23. ábra). A kulcsot ehhez egy amerikai csoport azon felismerése adta, hogy a GnRH a hipotalamuszból nem állandó mennyiségben, hanem pulzálva szabadul fel. A deszenzitizációt demonstráló vizsgálatok alapján ma már tudjuk, hogy a hipofízis a kb. 30—60 percenkénti GnRH pulzusokkal szemben nem válik érzéketlenné, csupán a hosszan tartó stimulus-



23. ábra. A GnRH és analógjainak felhasználása a reprodukciós funkciók befolyásolására

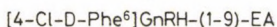
sal szemben. Ennek alapján tervezett terápiás programok segítségével legújabbban valóban kezelhetővé vált a hipotalamikus eredetű hipogonadizmus. Már is forgalomban vannak olyan speciális, a beteg által viselhető miniatűr pumpák, amelyek akár heteken, hónapokon át meghatározott időközökben GnRH pulzusokat juttatnak a szervezetbe, ily módon újra és újra stimulálva a gonadotropinok felszabadulását.

A GnRH pulzáló felszabadulásának felismerése új megvilágításba helyezte a GnRH metabolizmusának kérdését is. A hipotalamusz — hipofízis portális keringésben ugyanis a GnRH-t 20 és 800 pM közötti koncentrációban lehetett mérni, míg a perifériás keringésben a GnRH nem volt kimutatható. Ennek magyarázatára feltételezték, hogy a hipofízis lebontja a GnRH-t, legalábbis annak nagy részét. Ezt az elképzelést megerősítette az, hogy a hipofízis szövethomogenizátumokkal

végzett kísérletekben igen magas GnRH-bontó aktivitásokat találtak. Kérdéses maradt azonban ezeknek a vizsgálatoknak a fiziológiás megbízhatósága, hiszen feltételezhető volt, hogy a szétroncsolt sejtekből származó enzimek nagy részével a hormon nem kerül kapcsolatba fiziológiás körülmények között. Ezért, valamint a metabolizmus finomabb részleteinek megismerése céljából olyan kísérleti feltételeket és módszert választottunk, amely a lehetőségekhez képest a legjobban modellezi az élettani körülményeket: élő, működőképes sejteket tartalmazó sejt, ill. szövetkultúrákkal történt inkubálás során vizsgáltuk a hormon sorsát. Ezekhez a vizsgálatokhoz rendkívül érzékeny és specifikus detektálási módszert és tríciummal jelzett hormont használtunk.

Itt szeretnék egy rövid kitérőt tenni és visszatérni arra a kérdésre, amelyet a halogéntartalmú agonista származékok tárgyalásakor jeleztem. A radioaktív izotópokkal — a teljes molekulaazonosság érdekében elsősorban tríciummal — jelzett vegyületek, így a jelzett polipeptidhormonok felbecsülhetetlen szolgáltatottak a kutatásnak. A tríciummal jelzett polipeptidek előállítására mi dolgoztunk ki korábban egy általános érvényű módszert, amelynek használata azóta széles körben elterjedt. Ezt alkalmaztuk tríciummal jelzett GnRH-analógok előállítása során is (24. ábra). A kémiai szintézissel előállított, a 6. pozí-

cióban 4-klór-D-fenilalanint tartalmazó GnRH-származékot — mint prekuzort — az e célra megépített speciális készülékben, katalizátor jelenlétében, hordozómentes tríciummal hidrogéneztük. A módszer minden olyan eset-



kat/ ^3H



Radioaktivitás: 222 GBq/mmol
(6 Ci/mmol)

24. ábra. Tríciummal jelzett GnRH-analóg előállítása

ben alkalmazható, amikor katalikusan tríciummal cserélhető halogént tartalmazó aminosavat — ilyen lehet még a fenilalanin mellett a tirozin is — tudunk beépíteni a jelezni kívánt peptidbe.

Az eljárás lényegéből adódik, hogy segítségével különböző aminosav részekben specifikusan jelzett GnRH-analógokat lehet előállítani. Az így nyert nagy fajlagos aktivitású anyagokat igen előnyösen lehet használni az egyes analógok metabolizmusának vizsgálatához.

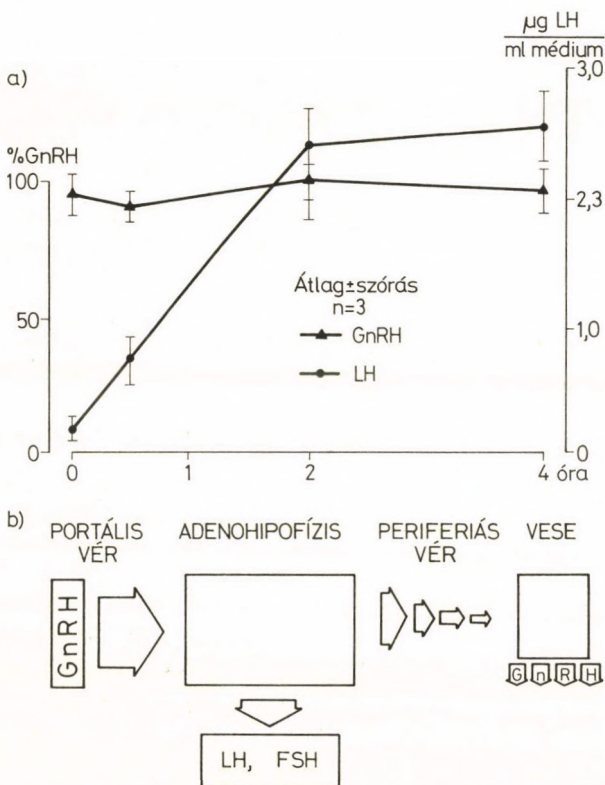
Ugyancsak előállítottuk a 9. pozícióban lévő prolinrészben specifikusan jelzett GnRH-t is. Ez esetben dehidro-L-prolint tartalmazó származékot készítettünk el, majd ezt az

ún. prekursor peptidet a már ismertetett módon — trícium gázzal katalitikusan hidrogéneztek.

Visszatérve a GnRH lebomlás vizsgálatokra, ez utóbbi módszerrel kapott 9. pozícióban tríciummal jelzett GnRH-val inkubáltunk hipofízis szövetmintákat, ill. kultúrában tartott hipofízis sejteket. Az inkubálás után nagy nyomású folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel analizáltuk a megfelelően kezelt elegyet. A vizsgálatok egyértelműen azt mutatták, hogy az intakt hipofízis sejtek nem bontják le a GnRH-t, tehát az változatlanul kerül ki a hipofízisből a perifériás vérrendszerbe. Hasonló eredményeket kaptunk intakt hipotalamusz sejtek (fötális hipotalamusz sejt-kultúra) esetében is. Ezek az eredményeink lényegében azt a korábban széleskörűen elfogadott nézetet döntötték meg, miszerint a hipotalamusz, ill. a hipofízis szintjén történő GnRH-lebomlás a hormonszint, és így a nemi működés hormonális szabályozásának fontos, meghatározó része. Egyidejűleg egy japán kutatócsoport kimutatta az ovulációt megelőző néhány perces GnRH „csúcs” megjelenését a perifériás vérkeringésben is. Mai nézetünk szerint tehát a GnRH a hipofízisben nem bomlik le, csupán a perifériás vérben „meghígul”, ezért volt korábban kimutathatatlan a mennyisége. Végül — a legújabb vizsgálatok szerint — a GnRH a vese tubulusaiban szenved proteolitikus lebomlást, majd fragmensei, illet-

ve aminosavak formájában ürül ki a szervezetből (25. ábra).

A 6. pozícióban tríciummal jelzett fenilalanint tartalmazó GnRH-analóggal — amely azonos az „Ovurelin”-nel — végeztük el az anyag szöveti eloszlásának tanulmányozását



25. ábra. A GnRH lebomlásának vizsgálata in vitro a) a bomlás mértéke b) a GnRH útja a szervezetben

Szervek	10 dpm/g szövet		
	15 perc	60 perc	240 perc
Máj	17,7 ± 4	26,3 ± 6	6,2 ± 2
Tüdő	11,5 ± 3	15,0 ± 5	7,9 ± 0,5
Vese	12,4 ± 4	13,5 ± 5	8,4 ± 3
Lép	11,8 ± 2	12,0 ± 1	10,2 ± 4
*Agy	2,7 ± 2	3,0 ± 3	2,0 ± 1
Hipofízis	6,8 ± 2	4,0 ± 1	2,9 ± 1
Vastagbél	3,5 ± 2	3,3 ± 2	4,2 ± 2
Vékonybél	8,4 ± 3	13,5 ± 4	5,6 ± 2
Vázizom	0,9 ± 1	2,2 ± 2	1,8 ± 1
Petefészek	1,8 ± 1	2,1 ± 1	1,6 ± 1

* Hipofízis nélkül

26. ábra. A radioaktivitás eloszlása nyulak különböző szerveiben ^3H -ovurelin adagolása után. (150 kBq/állat, intravénásan)

(26. ábra). Intravénás adás esetén a radioaktivitás legmagasabb értékeit a máj-, a vese-, a tüdő, illetve a vékonybél falában találtuk. A hipofízis/agy radioaktivitás arány a beadás első két órájában 1,8—2,0 között volt. A jelzett anyag — feltehetően a metabolitok — kiürülése 72 óra alatt több, mint 50%-os volt (27. ábra).

A távozó metabolitok szerkezetére a különböző aminosavrészben jelzett GnRH-analógok lebomlásának vizsgálatából vonhatunk le következtetéseket.

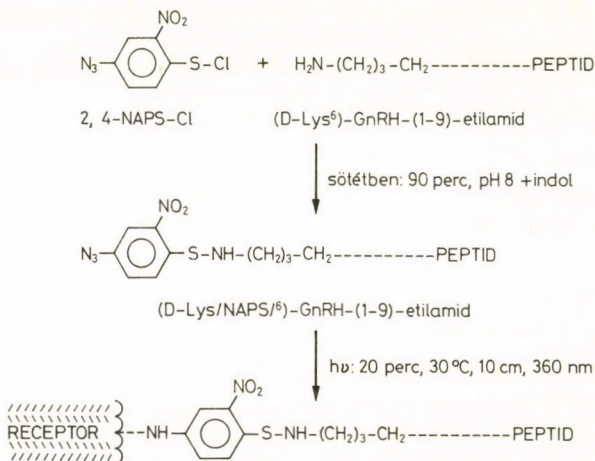
A gonadotropin releasing hormon hatásmechanizmusának jobb megértéséhez igen nagy segítséget jelenthet az izolált és tiszta állapot-

Idő (óra)	Kumulatív kiürülés a dózis százalékában	
	Vizelet	Széklet
6	24,0 ± 12	0
24	36,0 ± 17	0,7 ± 0,4
48	43,3 ± 18	7,2 ± 3,4
72	45,4 ± 18	9,0 ± 3,8
Ketrec mosófolyadék (72 óra alatt)		1,6

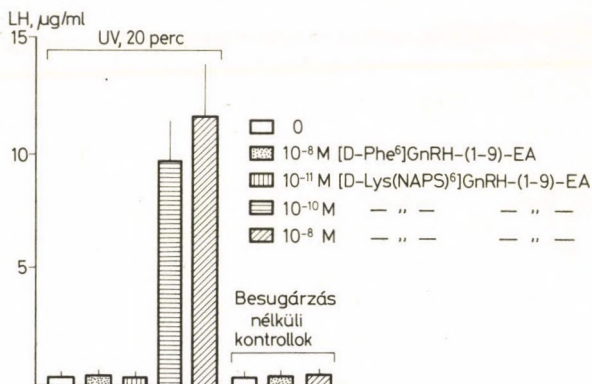
27. ábra. A radioaktivitás kiürülése ^3H -ovurelinnel kezelt nyulakból (300 kBq/állat, intravénásan)

ban hozzáférhető GnRH-receptor. A receptorhoz való kötődés jellemzőinek pontosabb ismerete rendkívül hasznos lehet további új, még hatékonyabb analógok tervezéséhez, illetve előállításához.

Az ilyen jellegű vizsgálatok számára alkalmasnak ígérkezik a fotoaffinitási jelzési módszer. Ennek a módszernek a lényege, hogy egy fotoreaktív csoportot tartalmazó analógot intenzív fényexpozícióval kovalensen kötünk a receptorhoz. E célra előállítottuk mind az agonista, mind az antagonist GnRH-analógok néhány fotoreaktív származékát, azzal a szándékkal, hogy ezek segítségével megkísérljük a receptor izolálását (28. ábra). Az így előállított és az ábrán is látható fotoreaktív származékkal sötétben inkubáltuk a hipofízis sejt kultúrát, majd bizonyos idő elteltével UV-fénnyel besugároztuk. Természetesen a vakpróbát is azonos módon készítettük el, csak a besugár-



28. ábra. Fotoreaktív GnRH-származék előállítás és kötése a receptorhoz



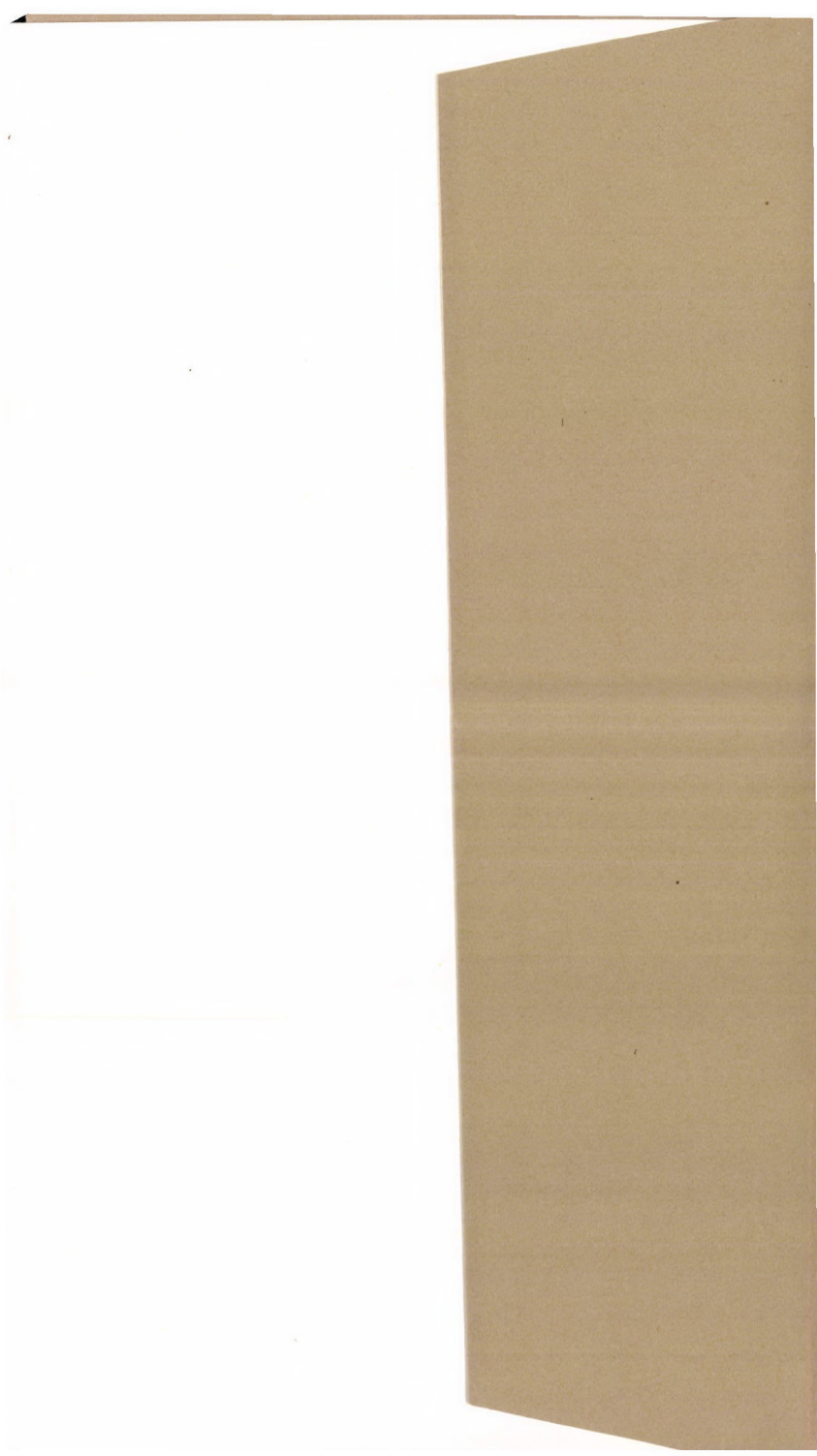
29. ábra. Fotoreaktív GnRH-analóg hatása hipofízis-sejtkultúrában

zást hagytuk el. Az LH felszabadulást a médiumokban RIA-val határoztuk meg.

Miután a 10^{-8} M NAPS-származékkal inkubált, de nem besugárzott mintából mosással a nem kovalensen kötött hormont teljesen eltávolítottuk (dark kontroll), az LH felszabadulást nem mutatott. Abban az esetben viszont, amikor hipofízis sejtek jelenlétében a 10^{-8} M [D-Lys (NAPS)⁶]-GnRH-etilamidot fotolízisnek vetettük alá, az LH felszabadulás a maximális tartományban jelentkezett. A vizsgálatok azt is kimutatták, hogy a kovalensen kötött hormon LH kibocsátásra gyakorolt hatása dóziszfüggő (29. ábra).

A fentiek alapján egyértelműen feltételezhető volt, hogy a hormon és a receptor sikeres, kovalens összekapcsolása alkalmas lehet a receptor izolálására, ami azóta meg is történt, részint ezeknek az eredményeknek a folytatásaként, részint egyéb módszerek segítségével.

A kiadásért felelős
az Akadémiai Kiadó és Nyomda Vállalat igazgatója
A nyomdai munkálatokat
az Akadémiai Kiadó és Nyomda Vállalat végezte
Felelős vezető: Zöld Ferenc
Budapest, 1991
Nyomdai táskaszám: 19719
Felelős szerkesztő: Kőmíves Veronika
Műszaki szerkesztő: Kiss Zsuzsa
Kiadványszám: 2815
Megjelent: 2,17 (A/5) ív terjedelemben
HU ISSN 0236-6258



Ára: 60,— Ft